

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 5/08, A61K 35/14, 38/19		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/28479
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Oktober 1995 (26.10.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00512		Birgit [DE/DE]; Auf dem Feldele 20, D-79227 Schallstadt (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 11. April 1995 (11.04.95)		(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).	
(30) Prioritätsdaten: P 44 12 794.4 14. April 1994 (14.04.94) DE		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): KLINIKUM DER ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG [DE/DE]; Hugstetter Strasse 49, D-79106 Freiburg (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KANZ, Lothar [DE/DE]; Sonnhalde 27, D-79104 Freiburg (DE), BRUGGER, Wolfram [DE/DE]; Eschenweg 10, D-79199 Kirchzarten (DE), HENSCHLER, Reinhart [DE/DE]; Ferd.-Weiss-Strasse 45, D-79106 Freiburg (DE), KÖHLER, Gabriele [DE/DE]; Langenhard-Strasse 16, D-79104 Freiburg (DE), SCHÄFER, Hans-Eckart [DE/DE]; Weinbergstrasse 15, D-79111 Freiburg (DE), LINDEMANN, Albrecht [DE/DE]; Bürgelstrasse 18d, D-79294 Sölden (DE), MERTELSMANN, Roland [DE/DE]; Sonnhalde 72, D-79104 Freiburg (DE), MACKENSEN, Andreas [DE/DE]; Kartäuserstrasse 92, D-79106 Freiburg (DE), FISCH, Paul [DE/DE]; Edith-Stein-Strasse 16, D-79110 Freiburg (DE), HERBST,			
(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING DENDRITIC CELLS, CELLS THUS PRODUCED AND CONTAINER FOR CARRYING OUT THIS PROCESS			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN, SO ERHALTENE ZELLEN UND BEHÄLTER ZUR DURCHFÜHRUNG DIESES VERFAHRENS			
(57) Abstract			
<p>Dendritic cells are therapeutically interesting as antigen-presenting cells. A process is disclosed for isolating at first peripheral blood cells, then enriching them in blood precursor cells that express the CD 34 antigen. These cells are multiplied ex vivo with hematopoietic growth factors associated with cytokines. At the end of 10-20 days, mainly dendritic cells are produced, which may if required be further purified. These cells are functionally active, being able to present antigens.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen in therapeutischer Hinsicht interessant. Offenbart wird ein Verfahren, bei dem zunächst periphere Blutzellen isoliert und daraus die Blutvorläuferzellen, die das CD 34-Antigen exprimieren, angereichert werden. Diese Zellen werden mit einer Kombination von hämatopoietischen Wachstumsfaktoren und Cytokinen ex vivo expandiert. Über einen Zeitraum von 10-20 Tagen entstehen daraus vor allem dendritische Zellen, die gegebenenfalls noch weiter gereinigt werden können. Diese Zellen sind funktionell aktiv hinsichtlich der Fähigkeit zur Antigenpräsentation.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Montenegro
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MV	Malawi
BD	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Grüneeland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
RJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Canada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SV	Slowenien
CN	China	LK	SRI Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Moskau	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen, so
erhaltene Zellen und Behälter zur Durchführung dieses
Verfahrens

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von dendritischen Zellen, die nicht nur in der Grundlagenforschung Anwendung finden können, sondern auch in therapeutischer Hinsicht vorteilhafterweise verwendet werden können.

Aus der EPA 92.400879.0 ist ein Verfahren zur Erzeugung von menschlichen dendritischen Zellen bekannt. Bei diesem Verfahren werden CD 34⁺-Zellen mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und entweder Interleukin-3 oder GM-CSF behandelt. Es hat sich allerdings herausgestellt, daß bei diesem Verfahren die gewünschten Zellen nicht in der erforderlichen Ausbeute und Reinheit erhalten werden können.

Dendritische Zellen stellen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des Organismus dar. Sie leiten sich von Knochenmarksvorläuferzellen ab, zirkulieren in geringer

Anzahl im peripheren Blut und zeigen sich als sogenannte Langerhans-Zellen bzw. terminal differenzierte Zellen (dendritische Zellen) in der Epidermis der Haut, der Gastrointestinal-Mukosa, viszeralen Pleura oder Epitelien des Urogenitaltraktes.

Nach Antigenexposition wandern diese Zellen aus der Haut in den Parakortex drainierender Lymphknoten, wo sie als terminal differenzierte Zellen eine spezifische T-Zellantwort auslösen. Die Funktion als Antigen-präsentierende Zellen lässt sich *in vitro* nachweisen in der autologen und allogenen "gemischten Lymphozytenreaktion" sowie in Testsystemen, in denen lösliche Antigene zugesetzt werden.

Die dendritischen Zellen lassen sich von Monozyten/Makrophagen abgrenzen, die ebenfalls Antigen-präsentierende Zellen darstellen, jedoch andere Oberflächenmarker exprimieren. Ein Unterscheidungsmarker ist insbesondere das CD 14-Antigen, welches bei dendritischen Zellen nicht gefunden wird, wohingegen Monozyten bzw. Makrophagen dieses Antigen aufweisen. Im Unterschied zu den Monozyten/Makrophagen, die stark phagozytierende Zellen sind, weisen diese Eigenschaft die dendritischen Zellen nicht auf. Bei den zirkulierenden dendritischen Zellen lassen sich die Oberflächenantigene wie folgt definieren: CD1a⁺, CD1c⁺, CD 13⁺, CD 33⁺, CD 14⁻, CD 16⁻, CD 3⁻, CD 19⁻, MHC II⁺.

Nach Kultivierung der Zellen *in vitro* bzw. nach physiologischer Stimulierung durch Antigen nimmt die Expression der MHC-II-Moleküle zu, ebenso findet sich eine Expression von CD 25, B 7, CD 40 und ICAM 1.

Die dendritischen Zellen (kurz: DC) sind Antigen-präsentierende Zellen, die mit hoher Effizienz die Aktivierung von T-Zellen induzieren können. Sie sind hochspezialisiert und für ihre Aufgabe optimal ausgestattet, denn dendritische Zellen exprimieren in großer Menge

Moleküle, die zur Präsentation von Antigen (MHC I und MHC II) notwendig sind. Darüber hinaus exprimieren diese Zellen die konstitutiv costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 an ihrer Oberfläche. Diese Moleküle wiederum sind für die Aktivierung der T-Zellen unerlässlich. Es befinden sich auch wichtige Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zellen, die einen innigen Kontakt zur Zielzelle garantieren.

Bei den dendritischen Zellen kann man zwei Reifungsstadien unterscheiden. Die Zellen vom Langerhans'schen Typ (kurz: LC) sind in nicht-lymphatischen Organen über den Körper verteilt. Ihre Aufgabe ist es, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren. Es gibt keine spezifischen Marker für diese Zellen, jedoch exprimieren sie die folgenden Marker: CD 1a, CD 11b, CD 33, HLA-DR und CD 80. Ein spezifischerer Nachweis ist elektronenmikroskopisch möglich. Elektronenmikroskopisch können die sogenannten Birbeck-Granula, die nur Langerhans'sche Zellen haben, nachgewiesen werden.

Im Körper wandern die Langerhans'schen Zellen nach Antigenkontakt aus der Peripherie des Körpers über das lymphatische System in die lymphatischen Organe. Auf diesem Weg differenzieren sie sich zu reifen immunstimulatorischen dendritischen Zellen aus, die kein Antigen mehr aufnehmen, dafür aber starke T-Zellantworten induzieren.

Es kann also zwischen Langerhans'schen Zellen und reifen dendritischen Zellen (kurz: DC) differenziert werden. Typisch für diese DC-Zellen ist eine Abnahme der CD 1a-Expression und eine zunehmende Expression von CD 4, CD 25 und CD 80.

Verwendung finden können die dendritischen Zellen beispielsweise bei der Verstärkung einer antiinfektiösen Therapie. Die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen sind von besonderer Bedeutung bei viralen und bakteriellen Infektionen und eine Zugabe dieser Zellen bei den entsprechenden

Infektionen kann insbesondere bei schweren Fällen vorteilhafte Auswirkungen auf den Patienten haben. Ein anderes Einsatzgebiet wäre die Impfung, weil hierdurch die Immunantwort des Körpers verstärkt wird.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren herstellbaren Zellen sind wegen ihrer starken Antigenpräsentation von besonderer Bedeutung. Man kann die erfindungsgemäß erhältlichen dendritischen Zellen für verschiedene Vakzinierungstherapien mit spezifischen Antigenen beladen, um auf diese Weise eine spezifische T-Zellantwort zu induzieren.

Weiterhin ist der Einsatz der erfindungsgemäß erhältlichen dendritischen Zellen in der Immuntherapie von malignen oder auch infektiösen Erkrankungen von großer Bedeutung. So können die erfindungsgemäß herstellbaren dendritischen Zellen individuell von jedem Patienten gewonnen werden und beispielsweise in der adoptiven Tumor-Immuntherapie mit spezifischen Tumorantigenen beladen werden, dem Patienten retransfundiert werden und so kann eine spezifische Immunantwort gegen den Tumor induziert werden.

Bei der Therapie von Infektionskrankheiten können die erfindungsgemäß erhältlichen dendritischen Zellen zur Verstärkung einer Impfreaktion bei immunsupprimierten Patienten eingesetzt werden, beispielsweise bei der Hepatitis-Impfung und gegebenenfalls bei einer Vakzinierung gegen HIV-Viren. Auch bei anderen Impfungen können die erfindungsgemäß erhältlichen dendritischen Zellen in vorteilhafter Weise eingesetzt werden.

Gerade bei Patienten, die sich einer Chemotherapie aufgrund einer Tumorerkrankung unterziehen müssen, ist die Bekämpfung von verschiedenen bakteriellen bzw. viralen Infektionen ein Problem, weil durch die Chemotherapie die Immunantwort des Patienten drastisch reduziert wird. Es ist daher erforderlich, daß gerade in diesen Fällen die Immunantwort

verbessert wird. Darüberhinaus können dendritische Zellen insbesondere bei der Therapie der minimal residuellen Erkrankungen verwendet werden. Hierbei werden tumorspezifische Antigene von den dendritischen Zellen präsentiert, die dann eine T-Zell-spezifische (cytotoxische) Reaktion hervorrufen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur ex vivo Expansion von dendritischen Zellen kann folgendermaßen vorgegangen werden: Von den Patienten werden heparinisierte Blutproben erhalten. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann von Zellen ausgegangen werden, die aus Blut isoliert wurden. Dies stellt einen erheblichen Vorteil dar gegenüber dem aus der EPA 92.400879.0 bekannten Verfahren, bei dem die Zellen aus dem Knochenmark oder dem Blut der Nabelschnur stammen müssen. Vorzugsweise können mononukleäre Zellen (MNZ) von dem Aphereseprodukt durch geeignete Trenntechniken, insbesondere durch eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (Pharmacia, Deutschland) isoliert werden.

In einer alternativen Ausführungsform können die CD 34⁺-Zellen aus Leukapheresat gewonnen werden, bei dem die mononukleären Zellen bereits angereichert sind.

Eine Anreicherung der mononukleären Zellen mittels Dichtezentrifugation kann sowohl dann erfolgen, wenn die CD 34⁺-Zellen direkt aus dem Blut gewonnen werden, wie auch dann, wenn die CD 34⁺-Zellen aus Leukapheresat gewonnen wurden. Eine Dichtezentrifugation ist bevorzugt, jedoch nicht unbedingt erforderlich.

Wenn die CD 34⁺-Zellen direkt aus dem Blut gewonnen wurden (heparinisierte Blutproben), könnte bereits eine Lyse der Erythrozyten ausreichen und als nächster Reinigungsschritt könnte sich eine Affinitätsäule oder ein anderer Anreicherungsschritt anschließen.

Wenn die CD 34⁺-Zellen direkt aus dem Leukapheresat gewonnen werden, können die Zellen nur nach einem Waschvorgang, auch ohne Ficollauf trennung, auf eine Affinitätsäule (beispielsweise CellPro) gegeben werden. Auf die Anreicherung mittels Ficoll-Gradienten kann insbesondere dann verzichtet werden, wenn bereits verhältnismäßig große Mengen an CD 34⁺-Zellen vorliegen, wie das beispielsweise bei der Hochdosis-Chemotherapie der Fall sein kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das Verfahren zur Bereitstellung von dendritischen Zellen folgende Schritte umfassen:

- a) Der Patient wird zur Mobilisierung der Stammzellen mit G-CSF behandelt, wobei übliche Konzentrationen an G-CSF verabreicht werden;
- b) nach einem geeigneten Zeitraum werden etwa 50 bis 100 ml Blut entnommen;
- c) bei niedrigem Gehalt an CD 34⁺-Zellen kann ein Ficoll-Trennungsschritt stattfinden;
- d) die Erythrozyten können lysiert werden;
- e) es kann ein CD 34⁺-Isolierungsverfahren durchgeführt werden, das in besonders bevorzugter Ausführungsform ein Affinitätschromatographieschritt ist;
- f) durch Zugabe von nachfolgend beschriebenen Wachstumsfaktoren/Zytokinen kann eine Differenzierung von Langerhans'schen Zellen bzw. dendritischen Zellen erzielt werden.

Die so erhaltenen Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen können je nach Einsatzzweck weiterbehandelt werden und dann wieder dem Patienten zugeführt werden. Insbesondere wenn

größere Mengen an Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen benötigt werden, wäre eine Leukapherese zur Stammzellreicherung hilfreich.

Die mononukleären Zellen werden weiter behandelt, um diejenigen Zellen anzureichern, die das CD 34-Oberflächenantigen besitzen. In der Veröffentlichung "Engraftment After Infusion of CD 34⁺ Marrow Cells in Patients With Breast Cancer or Neuroblastoma" (Blood, Vol. 77, Nr. 8 (1991) S. 1717-1722) haben Berenson et al. das CD 34-Antigen beschrieben. Die Anreicherung dieser Zellen kann dadurch erfolgen, daß die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert werden, der spezifisch ist für das CD 34-Antigen, wobei der Antikörper vorzugsweise biotinyliert ist. Derartige monoklonale Antikörper können käuflich erworben werden, beispielsweise von Dianova, Coulter, CellPro oder Becton Dickinson. Die mit dem monoklonalen Antikörper behandelten Zellen werden auf Immunoaffinitätssäulen, vorzugsweise Avidin-Immunoaffinitätssäulen, geladen, wobei das Avidin die monoklonalen Antikörper bindet und folglich auch die hieran gebundenen, CD 34⁺-Zellen. Die absorbierten Zellen mit dem CD 34-Oberflächenantigen werden von der Immunoaffinitätssäule entfernt und in ein geeignetes Medium gebracht.

Ebenso könnten die für das CD 34-Antigen spezifischen monoklonalen Antikörper auch direkt an eine Festphase (z.B. kleine Perlen etc.) gebunden werden, um die CD 34⁺-Zellen zu fixieren und aus der Mischung zu entfernen.

Weiterhin ist es möglich, die CD 34⁺-Zellen unter Verwendung eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers anzureichern, der käuflich erhältlich ist, beispielsweise von Becton Dickinson. Bei diesem Verfahren werden mobilisierte periphere Blutvorläuferzellen mit einem Anti-CD 34-Antikörper, der eine Fluorochrommarkierung hat, umgesetzt. Mit der Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers ist es möglich, die Zellen zu trennen, um die CD 34⁺-Zellen zu erhalten. Auf

diese Weise können hoch gereinigte Zellen erhalten werden. Eine andere Möglichkeit wäre es, die CD 34⁺-Zellen dadurch abzutrennen, daß magnetische Perlen (beads) verwendet werden, die von Dynal, Baxter, Milteny und anderen Firmen käuflich erhältlich sind.

Die angereicherten CD 34⁺-Zellen wurden anschließend in einem geeignetem Kulturmedium kultiviert. Ein derartiges Medium ist beispielsweise ergänztes RPMI 1640-Medium, das 10% fötales Kälberserum enthält. Das Kulturmedium kann auch heparinisiertes autologes Plasma, vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 1% enthalten. In bevorzugter Weise wird als Kulturmedium das RPMI 1640-Medium verwendet, das ergänzt wird mit 200 mM L-Glutamin, 50 µM 8-Mercaptoethanol, 100 mM Natriumpyruvat, 50 µg/ml Streptomycin, 50 U/ml Penicillin, MEM-Vitamine und 10% fötales Kälberserum.

Bei der Expansion der Zellen wurden die Zellen in Gegenwart einer Kombination von verschiedenen Wachstumsfaktoren angezogen. Hierbei wurden die folgenden Wachstumsfaktoren verwendet:

"Interleukin-1 (IL-1), beschrieben von Gery I. et al., Method Enzymol. 116, 456-467 (1985); Lachmann et al., Methods Enzymol. 116, 467-497 (1985); March et al., Nature 315, 641 (1985);

Interleukin-3 (IL-3), beschrieben in EPA 138 133, Ihle et al., Methods Enzymol. 116, 540-552 (1985); Otsuka et al., J. Immunol. 140, 2288-2295 (1988);

Interleukin-4 (IL-4) erhältlich von Genzyme Corp.;

Interleukin-6 (IL-6), beschrieben in Brakenhoff et al., J. Immunol. 139, 4116-4121 (1987), Brakenhoff et al., J. Immunol. 143, 1175-1182 (1989);

Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) erhältlich von Genzyme Corp.;

Erythropoietin (EPO), beschrieben von Jacobs et al., Nature 313, 806-810 (1985), Sasaki et al., Methods Enzymol. 147, 328-340 (1987);

Stammzellfaktor (SCF), beschrieben in WO 91/05 797, Nocka et al., EMBO J. 9, 3287-3294 (1990) und

Interferon- γ (IFN- γ), beschrieben in EP 77 670, Gray et al., Nature 295, 503-508 (1982); Devos et al., Nucl. Acids Res. 10, 2487-2501 (1982); Yip et al., PNAS 79, 1820-1824 (1982) und Braude, Methods Enzymol. 119, 193-199 (1986)."

Es wurde herausgefunden, daß durch eine Kombination der folgenden Wachstumsfaktoren: IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF eine Expansion der CD 34 $^{+}$ -Vorläuferzellen erfolgt. Wenn diese fünf Wachstumsfaktoren eingesetzt wurden, konnten etwa 1 bis 5% dendritische Zellen, die das Oberflächenantigen CD 1a exprimieren, erhalten werden. Derartige Zellen können auch elektronenmikroskopisch durch den Nachweis der sogenannten Birbeck-Granula identifiziert werden. Durch die Zugabe von TNF- α und GM-CSF konnte die Ausbeute an dendritischen Zellen deutlich erhöht werden.

Die Zellen werden in Gegenwart der Wachstumsfaktoren IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF kultiviert. Wesentlich ist dabei, daß die Zellen in Gegenwart von Stammzellenfaktor kultiviert werden, wobei das Medium noch weitere Cytokine bzw. Wachstumsfaktoren enthalten muß.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expansion der Zellen in Gegenwart einer Kombination von SCF, GM-CSF und TNF- α . Gegebenenfalls kann noch zusätzlich IL-4 (Interleukin-4) zugesetzt werden (10-1000 ng/ml).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erfolgt die Differenzierung zu dendritischen Zellen durch eine Verwendung der Cytokine IL-1 β , IL-3, IL-6, SCF und EPO, die zusammen mit den Cytokinen IL-4 und GM-CSF eingesetzt werden.

Die Kultivierung unter Verwendung der oben genannten Cytokine führt dazu, daß innerhalb von zwei bis drei Wochen eine große Zahl der Zellen ausreift, die nach Morphologie und Markerprofil typische Zellen vom Langerhans-Typ sind. Nach etwa fünf Wochen Kultur in Medium, das die sieben genannten Cytokine enthält, nehmen die Zellen den Phänotyp von reifen dendritischen Zellen an. Typisch für dieses Reifungsstadium ist ein Verlust der Birbeck-Granula, die Abnahme der CD 1a-Expression und eine zunehmende Expression der Oberflächenmarker CD 4, CD 25 und CD 80.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist eine sequentielle Zugabe der Cytokine besonders bevorzugt, um die Differenzierung der Zellen noch besser steuern zu können. Bei dieser Ausführungsform werden die Vorläuferzellen zunächst unter Verwendung der Cytokine IL-1 β , IL-3, IL-6, SCF und EPO expandiert für die Dauer von ein bis zwei Wochen. Nach dieser Zeit ist die Proliferation bereits zum großen Teil abgeschlossen und die Zellen werden in ein Medium überführt, das nur die Cytokine IL-4 und GM-CSF enthält. Auf diese Weise kann man die Zellen auf ihrem Differenzierungsweg von den Langerhans'schen Zellen zu den dendritischen Zellen auf der Stufe der Langerhans'schen Zellen aufhalten und somit alle Zellen in einen annähernd gleichen Differenzierungszustand bringen. In diesem Stadium sind die Zellen besonders gut geeignet, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren.

Sofern eine einheitliche Population von dendritischen Zellen für den gewünschten Einsatzzweck erforderlich ist, können die dendritischen Zellen durch entsprechende Trennverfahren angereichert bzw. gereinigt werden. Ein Trennverfahren könnte

beispielsweise darin bestehen, daß die Zellen mit monoklonalen Antikörpern umgesetzt werden, die gegen das CD 1a-Oberflächenantigen gerichtet sind. Diese Zell-Antikörper-Komplexe können dann auch über Immunoaffinitätsäulen oder FACS (Fluoreszenz aktivierte Zellsorter) aufgetrennt werden.

Die verwendete Konzentration der Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine liegt innerhalb der gewöhnlich verwendeten Konzentration, die die höchste Effizienz in ex vivo Kulturen aufweist. IL-1 kann in einer Konzentration im Bereich von 10 ng/ml bis 1.000 ng/ml verwendet werden, IL-3 wird in einer Konzentration von 1 E/ml bis zu 1.000 E/ml verwendet, IL-4 wird in einer Konzentration von 1 E/ml bis zu 1.000 E/ml verwendet, IL-6 wird von 10 E/ml bis zu 1.000 E/ml verwendet. EPO kann in einer Konzentration im Bereich von 0,1 E/ml bis 10 E/ml vorhanden sein. SCF wird zwischen 10 ng/ml bis zu 1.000 ng/ml verwendet und IFN- γ kann im Bereich von 1 E/ml bis 1.000 E/ml verwendet werden. Für GM-CSF liegen die verwendeten Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 1.000 ng/ml und für TNF- α zwischen 10 E/ml und 1.000 E/ml.

Die bevorzugten Bereiche für IL-1 liegen zwischen 10 ng/ml und 150 ng/ml, für IL-3 zwischen 50 E/ml und 150 E/ml, für IL-4 zwischen 50 ng/ml und 200 ng/ml, für IL-6 zwischen 50 E/ml und 150 E/ml, für EPO von 0,5 E/ml bis 1,5 E/ml, für SCF von 10 ng/ml bis 150 ng/ml, für GM-CSF von 50 ng/ml bis 200 ng/ml, für TNF- α von 20 E/ml bis 150 E/ml und für IFN- γ von 50 E/ml bis 150 E/ml. Es liegt im Bereich der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmannes, die beste Wirkungsfähigkeit der Wachstumsfaktoren bzw. Cytokine zu bestimmen. Für die oben angegebenen Einheiten gibt es international anerkannte Normen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die peripheren Blutvorläuferzellen von krebskranken Patienten erhalten, die durch herkömmliche Chemotherapie und koloniestimulierende Faktoren mobilisiert

wurden, um eine Behandlungstherapie mit breiter Antitumoraktivität mit der gleichzeitigen Mobilisierung von peripheren Blutvorläuferzellen zu kombinieren. Eine Mobilisierung kann erhalten werden durch Behandlung der Patienten mit einer Standarddosierung VP 16 (500 mg/m²) Ifosfamid (4 g/m²) Cisplatin (50 mg/m²) und gegebenenfalls Epirubicin (50 mg/m²) (VIP (E) Therapie), gefolgt von der Verabreichung von G-CSF (erhältlich von Amgen) in einer Dosierung von 5 µg/kg/d subkutan für 12 bis 14 Tage. Ebenso ist es möglich, GM-CSF zu verabreichen, was zum Beispiel unter dem Warenzeichen "Leukomax" von Sandoz AG, Basel kommerziell erhältlich ist. Die Krebspatienten können auch mit einer Chemotherapie behandelt werden bestehend aus Etoposid (VP 16), Ifosfamid und Cisplatin gefolgt von der kombinierten sequentiellen Verabreichung von rekombinanem Human-interleukin-3 (rhIL-3) und rekombinantem humanem Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (rhGM-CSF).

Es ist besonders bevorzugt, die peripheren Blutvorläuferzellen vom Patienten zwischen Tag 10 und Tag 18 nach der Chemotherapie zu erhalten.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Kulturmedium für dendritische Zellen umfassend eine Kombination von IL-1, IL-3, IL-6, EPO und SCF und gegebenenfalls Interferon-γ sowie TNF-α. Ein anderes erfindungsgemäßes Kulturmedium umfasst eine Kombination von SCF, GM-CSF und TNF-α.

Ein im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugtes Kulturmedium für dendritische Zellen umfasst eine Kombination von IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, SCF, EPO und GM-CSF.

Die erfindungsgemäßen Kulturmedien dienen der in vitro-Generierung von Langerhans'schen Zellen bzw. dendritischen Zellen und umfassen die oben erwähnten Kombinationen von Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen.

Die biologisch aktiven Verbindungen werden in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet. Es ist möglich, geeignete Aufnahmegeräte bereitzustellen, die mit einem Kulturmedium zur Züchtung von peripheren Blutvorläuferzellen ausgestattet sind umfassend die oben beschriebene Kombination von Wachstumsfaktoren. Solche Aufnahmegeräte können Blutbeutel, Mikrotiterplatten oder Gewebegefäßchen sein. Solche gebrauchsfertigen Aufnahmegeräte sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Beispiel 1

Mobilisierung von peripheren Blutvorläuferzellen (PBPC)

18 Patienten wurden als Teil ihrer Induktionschemotherapie mit einer herkömmlichen Dosis VP 16 (500 mg/m²), Ifosfamid (4 g/m²) und Cisplatin (50 mg/m²) (VIP) behandelt, mit anschließender Verabreichung von rekombinantem humanem G-CSF (Amgen, Deutschland) in einer Dosis von 5 µg/kg/d subkutan für 10 bis 14 Tage zur Mobilisierung von PBPCs. 12 Patienten mit soliden Tumoren und 6 Patienten mit refraktärem non-Hodgkin Lymphomen waren eingeschlossen. PBPCs wurden 10 bis 12 Tage nach VIP Chemotherapie gesammelt. Die peripheren Blutvorläuferzellen wurden durch Leukapheresen entnommen unter Verwendung einer sogenannten "Kleinvolumenkanne" (erhältlich von Baxter) an Tag 10-12 nach der VIP Chemotherapie gemäß dem Verfahren, das von Brugger et al. in J. Clin. Oncol. 20, S. 1452-1459 (1992) und Brugger et al., British J. of Haematology 84, S. 402-407 (1993) beschrieben wurde.

Beispiel 2Kultur von gezüchteten PBPCs

Aus dem Aphereseprodukt wurden mononukleäre Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque (1.077 g/ml) (erhältlich von Pharmacia) isoliert und zweimal in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.

Periphere Blut- oder Knochenmarks-MNC-Zellen wurden kultiviert wie im Stand der Technik beschrieben (z.B. Kanz et al., Blood, 68, 991 (1986)). MNC (1×10^5) wurden in Methylcellulose (0,9%) immobilisiert und in IMDM supplementiert mit 30% fötalem Kälberserum (Paesel, Deutschland) kultiviert.

Beispiel 3positive Auswahl von CD 34⁺-Zellen von gezüchteten PBPCs durch Immunoaffinitätsadsorptionssäulen

Mononukleäre Zellen (MNCs) wurden mit einem biotinylierten IgM Anti-CD 34 monoklonalem Antikörper inkubiert, gewaschen und auf eine Avidin-Immunoaffinitätssäule aufgetragen. Adsorbierte CD 34⁺-Zellen (Zielzellenpopulation) wurden von der Avidinsäule entfernt und in RPMI 1640 Medium (Seromed, Deutschland) resuspendiert, das mit 3 mmol/L Glutamin und 5×10^{-5} mol/L β -Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland) ergänzt wurde.

Beispiel 4Expansion von angereicherten CD 34⁺-Zellen in Suspensionskultur

Angereicherte CD 34⁺-Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit flachem Boden kultiviert bei 0,5 bis 15 $\times 10^3$ Zellen/mL in RPMI 1640 Medium supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum bzw. verschiedenen Konzentrationen von autologem Plasma. Die oben beschriebene Kombination von Wachstumsfaktoren wurde unmittelbar nach Aussaat der CD 34⁺-Zellen in die Mikrotiterplatten (Gesamtvolumen 200 µL/Behälter) hinzugefügt. Vierfache Kulturen von jeder einzelnen der getesteten 36 Wachstumsfaktor-Kombinationen wurden hergestellt. Die folgenden hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Cytokine wurden verwendet: IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, TNF- α , IFN- γ , SCF. Wachstumsfaktoren wie IL-1, GM-CSF, IFN- γ und SCF in einer Konzentration von 100 ng/ml bzw. in einer Konzentration von 100 E/ml (IL-3 und IL-6). Erythropoietin wurde in einer Konzentration von 1 E/ml und TNF- α in einer Konzentration von 50 E/ml verwendet. Die Zellen wurden bis zu 28 Tage bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert ohne zusätzliche Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Medium. Zur Analyse wurde jeder Behälter resuspendiert und in RPMI 1640 gewaschen zur Entfernung von restlichen Wachstumsfaktoren. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Trypanblaufarbstoff-Ausschluß sowie durch durchflusscytometrische Färbung mit Propidiumiodid bewertet.

Beispiel 5Herstellung dendritischer Zellen durch eine ex vivo Expansion peripherer CD34⁺-Blutprogenitorzellen

CD34⁺-Blutvorläuferzellen werden wie in Beispiel 4 angegeben in einer Zelldichte von 0,5 bis 3x10⁴/ml in RPMI 1640 Medium in 25 ml Zellkulturflaschen über einen Zeitraum von

max. 21 Tagen kultiviert. Dem Kulturmedium werden folgende Wachstums-faktoren und Cytokine zugeführt: IL-1 α , IL-3, IL-6, SCF und Erythropoietin in den unter Beispiel 4 genannten Konzentrationen. In einem zweiten Kulturansatz werden, um die Ausbeute an dendritischen Zellen zu erhöhen, dem Medium TNF- α , GM-CSF sowie SCF zugesetzt.

Wöchentlich werden Proben aus den Kulturen entnommen und darin der Immunphänotyp durchflußcytometrisch mit einem FACScan-Analyzer (Becton Dickinson) analysiert. Die Daten werden mit dem FACScan Lysis 2 Software-Programm ausgewertet. Für die Zweifarben-Markierung werden die Zellen in PBS mit 2% FCS gewaschen und mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD33 zusammen mit je einem der folgenden FITC-konjugierten Antikörper für 30 Minuten bei 4°C inkubiert: Anti-HLA-DR, anti-CD4, anti-CD1a (alle von Becton Dickinson) und anti-CD25 (Dako). Darüber hinaus werden Einfachmarkierungen mit Antikörpern gegen CD1b, CD1c und CD40 (Dyanova, Hamburg) durchgeführt. Diese Antikörpermarkierung erfolgt nach der indirekten Methode. Um den prozentualen Anteil der Zellen aus der granulozytären bzw. monozytären Reifungskaskade zu ermitteln, werden die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen CD15 (Granulozyten) und CD14 (Monozyten) markiert. Als Negativkontrollen werden Isotypkontrollen (IgG1-FITC und IgG2a PE-konjugiert) von der Maus durchgeführt. Nach Abschluß der Inkubation werden die Zellen 2 x gewaschen und in 250 µl PBS ohne FCS-Zusatz zur durchflußcytometrischen Analyse resuspendiert. Zum Ausschluß toter Zellen wird aus jeder Probe unmittelbar vor der Messung Propidium-Jodid (PI) zugegeben, die PI-markierten toten Zellen werden schließlich vor der Analyse entsprechend ausgesegrenzt. Aus jeder Probe werden 20.000 Zellen analysiert.

Ergebnisse:

Nach 12 Tagen beträgt der Anteil CD1a⁺ Zellen in der Kultur mit TNF, GM-CSF und SCF etwa 20%, diese Zellen exprimieren zusätzlich HLA-DR-Moleküle, die ebenfalls ein Marker für dendritische Zellen darstellen. Da jedoch nur Langerhans'sche Zellen den Oberflächenmarker CD1a in hohem Maße exprimieren, kann die tatsächliche Anzahl an dendritischen Zellen noch deutlich höher liegen. Weiterhin werden CD1c bei ca. 17% und CD40 bei ca. 45% der Zellen exprimiert. Auch diese Moleküle sind Marker von dendritischen Zellen.

Das Medium, welches mit IL-1, IL-3, IL-6, SCF und Erythropoietin komplementiert war, ergab zwar eine größere Anzahl klonogener Vorläuferzellen, jedoch war der Anteil an dendritischen Zellen signifikant geringer. CD1a⁺ Zellen wurden in ca. 4% aller ex vivo-expandierten Zellen gefunden, CD1c-exprimierende Zellen betrugen 3%, CD40-exprimierende Zellen ca. 2%.

Beispiel 6

Es wurden die verschiedenen Kulturbedingungen miteinander verglichen und bestimmt, welche Kombination von Wachstumsfaktoren höchstmögliche Ausbeuten an Langerhans'schen Zellen bzw. dendritischen Zellen ermöglichte. Nach einer Avidin-Immunoaffinitätssäule wurden Zellen erhalten, die zu etwa 60% den Marker CD 34⁺ aufwiesen. Diese Zellen wurden in einem RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert. Als Wachstumsfaktoren wurde zunächst eine Mischung der Cytokine SCF, EPO, IL-1 β , IL-3 und IL-6 verwendet. Diese Mischung wurde mit der Kurzbezeichnung SE 136 versehen. Durch die Verwendung dieses Cocktails wurde eine hohe Expansion der Zellen mit Zellkern und der klonogenen Vorläuferzellen erhalten.

Um spezifisch eine Differenzierung zu Langerhans'schen Zellen bzw. dendritischen Zellen zu erhalten, wurde entweder eine Kombination von TNF- α /GM-CSF mit SE 136 oder von IL-4/GM-CSF mit SE 136 eingesetzt. Als Kontrolle diente IL-4/GM-CSF. Die Ergebnisse dieses Versuches werden in der Tabelle 1 dargestellt, wobei die Gesamtausbeute an kernhaltigen Zellen und Zellen mit CD 1a $^{+}$ -Marker ebenso dargestellt ist, wie die Oberflächenstruktur dieser Zellen.

Tabelle 1 zeigt, daß die Zugabe der Cytokine IL-4/GM-CSF zu dem SE 136-Cocktail die höchste Ausbeute an Zellen mit dem Marker CD 1a $^{+}$ bewirkte. Die Ausbeute betrug bis zu 45% der gesamten kernhaltigen Zellen. Je nach Reinheit der Affinitätssäule kann die Ausbeute bis zu 65 % erhöht werden. Der Einsatz von TNF- α /GM-CSF zusammen mit dem Cocktail SE 136 ergab eine geringere Ausbeute an CD 1a $^{+}$ -Zellen. Ein großer Teil der Zellen wies die Marker CD 15 und CD 14 auf, was dafür spricht, daß diese Kulturbedingungen die Differenzierung zu Granulozyten und Monozyten begünstigt.

Periphere Blutvorläuferzellen mit dem Marker CD 34 $^{+}$, die mit IL-4/GM-CSF angezogen wurden, wiesen einen hohen Prozentsatz an CD 1a $^{+}$ -Zellen auf, aber zeigten keine Expansion dieses Zelltyps. Das Beispiel zeigt daher, daß die optimale Ausbeute an Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen durch eine Kombination der Wachstumsfaktoren IL-4/GM-CSF zusammen mit den Faktoren SCF, EPO, IL-1 β , IL-3 und IL-6 erhalten wird.

Tabelle 1. Zellausbeute und Phänotyp der peripheren Blutvorläuferzellen mit den Marker CD 34⁺, die in Gegenwart von verschiedenen Cytokinkombinationen kultiviert wurden

	SE136 ¹ +TNF- α /GM-CSF	SE136 +IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF
Ausbeute an Gesamtzellen mit Kern			
Tag 0	1,0 x 10 ⁶ #	1,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶
Tag 7	6,4 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶
Tag 10	2,5 x 10 ⁷	2,9 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁶
Tag 15	8,2 x 10 ⁷	4,9 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁶
Tag 20	1,1 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁶
Tag 24	1,0 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁷	6,8 x 10 ⁶
Tag 27	1,0 x 10 ⁸	3,7 x 10 ⁷	5,0 x 10 ⁶
Zellausbeute an Zellen mit CD14⁺-Marker			
Tag 7	1,4 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	ND
Tag 10	7,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	ND
Tag 15	2,2 x 10 ⁶	5,2 x 10 ⁶	7,5 x 10 ⁵
Tag 20	2,7 x 10 ⁶	9,3 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶
Tag 24	2,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁶
Tag 27	2,0 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁷	2,5 x 10 ⁶
Oberflächenmarker²			
CD 1a	-	++	++
HLA-DR	++	+++	+++
B7-1	-	+	+
CD 14	++	+	+
CD 15	+++	++	++

¹ SE136 ist ein Cytokin-Cocktail, der SCF, EPO, IL-1B, IL-3 und IL-6 umfaßt.

² Antigenexpression der verschiedenen Zellpopulationen wurde durch Durchflußzytometrie am Tag 20 bestimmt. Die Oberflächenmarkerexpression wurde dem folgenden Verteilungssystem zugeordnet, wobei folgende Einteilung bezogen auf die Zellzahl gewählt wurde: - = <5%; + = 5-25%; ++ = 25-50%; +++ = 50-100%; ND = nicht bestimmt. #Die Ergebnisse basieren auf sechs verschiedenen Experimenten.

Beispiel 7

Anhand des im folgenden näher beschriebenen Versuchs zum Nachweis der Antigenpräsentation von Tetanus-Toxoid wird die Verwendung der erfindungsgemäßen dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen zur Induktion einer Immunantwort näher erläutert. Anstelle des Tetanus-Toxoids können auch andere Antigene, wie Tumorantigene bei dieser Verwendung eingesetzt werden.

a) Bereitstellung von vorstimulierten PBMCs

Einem Patienten wurden vor Beginn der Chemotherapie und der Gabe von G-CSF 30 ml Blut abgenommen. Aus diesem Blut wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mittels Ficoll-Gradienten isoliert. Die PBMCs wurden anschließend mit Tetanus-Toxoid (erhältlich von den Behringwerken, Marburg) vorstimuliert, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

1×10^7 PBMCs wurden mit 1:80 verdünntem Tetanus-Toxoid in Medium kultiviert, das 10% humanes Serum enthielt. Nach sieben Tagen wurden den Zellen 50 U/ml IL-2 zugesetzt und diese dann für weitere vier Tage kultiviert. Die so vorstimulierten Zellen wurden zunächst eingefroren und zwei Tage vor Beginn des Antigenpräsentationsexperiments wieder aufgetaut. Bei diesem Verfahren nutzt man aus, daß in den PBMCs bereits antigenpräsentierende Zellen enthalten sind, die Tetanus-Toxoid aufnehmen und den ebenfalls vorhandenen T-Zellen präsentieren können. Auf diese Weise erreicht man eine Vorstimulierung der Tetanus-Toxoid-spezifischen T-Zellen und vor allem durch die Zugabe von IL-2 auch eine Anreicherung dieser Zellen, da dieses Cytokin das Überleben bzw. Wachstum der T-Zellen unterstützt, während die meisten anderen Zelltypen absterben.

b) Bereitstellung der Langerhans'schen/dendritischen Zellen
Von dem Patienten wurden nach Chemotherapie und Gabe von G-CSF Vorläufer-Zellen mit dem Marker CD 34⁺ durch

Leukapherese und anschließende Affinitätschromatographie isoliert. Diese Zellen wurden unter Verwendung der bevorzugten Cytokinkombination (SCF, EPO, IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-4 und GM-CSF) kultiviert und gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren zu Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen differenziert.

In einem anderen Ansatz wurden einige CD 34 $^{+}$ -Zellen in einem Medium kultiviert, das nur die fünf Expansionscytokine IL-1 β , IL-3, IL-6, SCF und EPO enthielt.

Am 24. Tag wurden die Zellen mit einem FACS-Sorter der Firma Becton-Dickinson sortiert, wobei zwei Subtypen dendritischer Zellen, nämlich einmal CD 1a $^{+}$ /CD 14 $^{-}$ und andererseits CD 1a $^{+}$ /CD 14 $^{+}$ isoliert wurden.

c) Antigenpräsentationsexperiment

Die gemäß b) beschriebenen Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen wurden zunächst bestrahlt, um ein weiteres Wachstum dieser Zellen sicher ausschließen zu können. Dann wurden diese Zellen mit den gemäß a) erhaltenen vorstimulierten peripheren mononukleären Zellen gemischt und in Mikrotiterplatten verbracht. In den Kontrollansätzen wurden die Zellen ohne Zugabe von Tetanus-Toxoid kultiviert, sonst wurde Tetanus-Toxoid in einer Verdünnung von 1:80 zugesetzt.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Figur 1 dargestellt. Bei dem Versuch wurden folgende Zellpopulationen auf ihre Antigenpräsentationsfähigkeit hin getestet:

- a) Sortierte CD 1a $^{+}$ /CD 14 $^{-}$ -Zellen (LC/DC), dargestellt als Kreis;
- b) Sortierte CD 1a $^{+}$ /CD 14 $^{+}$ -Zellen (LC/DC), dargestellt als Dreieck;
- c) Unsortierte Zellen der LC/DC-Kultur (LC), dargestellt als Rechteck;
- d) Unsortierte Zellen der Kultur, die nur die Expansionscytokine enthielt (KC), dargestellt als Raute;

- e) Nur PBMCs (Kontrolle);
- f) Nur antigenpräsentierende Zellen (a bis d).

Die Ansätze wurden für zwei Tage kultiviert, dann wurde ^3H -Thymidin zugesetzt und für weitere 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die counts per minute (CPM) bestimmt. Da ^3H -Thymidin beim Wachstum in die Zellen eingebaut wird, sind die counts per minute ein Maß für die T-Zellproliferation und damit ein Maß für die Antigenpräsentationsfähigkeit der eingesetzten Zellen.

Aus dem Versuch können die folgenden Schlüsse gezogen werden:

- a) PBMCs allein zeigen keine Proliferation;
- b) antigenpräsentierende Zellen (alle eingesetzten Populationen) allein zeigen keine Proliferation (Bestrahlung);
- c) PBMCs + antigenpräsentierende Zellen zeigen keine Proliferation;
- d) PBMCs + antigenpräsentierende Zellen + Tetanus-Toxoid zeigen aber, abhängig von der eingesetzten Zellart eine starke Proliferation. Die sortierten LC/DC-Populationen (CD 1a $^+$ /CD 14 $^-$ und CD 1a $^+$ /CD 14 $^+$) induzieren die stärkste Proliferation. Die unsortierte LC/DC-Population induziert etwas weniger. Dies ist darauf zurückzuführen, daß diese Zellpopulation auch noch andere Zellen enthält, die nicht antigenpräsentierend sind. Die KC-Population, d.h. die Zellen, die nur die Expansionscytokine IL-1 β , IL-3, IL-6, SCF und EPO enthielt, induzierte nur eine schwächere Proliferation.

Das vorliegende Experiment zeigt, daß die Langerhans'schen Zellen/dendritischen Zellen, die unter Verwendung des besonders bevorzugten Cytokin-Cocktails *in vitro* generiert wurden, in hervorragender Art und Weise Antigen aufnehmen, präsentieren und sehr starke T-Zell-Antworten induzieren können. Diese Eigenschaft ist dann geringer ausgeprägt, wenn IL-4 und GM-CSF nicht zugegen sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bereitstellung von dendritischen Zellen, worin
 - a) periphere Blutzellen vom Blut isoliert werden,
 - b) periphere Blutvorläuferzellen, die das CD 34-Antigen exprimieren, angereichert werden, und
 - c) diese Zellen mit einer Kombination von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und/oder Cytokinen kultiviert werden und gegebenenfalls anschließend
 - d) die dendritischen Zellen angereichert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen aus heparinisierten Blutproben durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die peripheren Blutvorläuferzellen durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque isoliert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen mit einem gegen das Oberflächenantigen CD 34 gerichteten monoklonalen Antikörper umgesetzt werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, worin die peripheren Blutvorläuferzellen, die mit dem gegen das CD 34-Oberflächenantigen gerichteten monoklonalen Antikörper umgesetzt wurden von den nicht umgesetzten Zellen durch Behandlung mit einer Immunoaffinitätssäule, insbesondere einer Avidin-Immunoaffinitätssäule abgetrennt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen durch Kultivieren in einem Zellwachstums-

medium expandiert werden, das Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO) und Stammzellenwachstumsfaktor enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen in einem Zellwachstumsmedium expandiert werden, das Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie gegebenenfalls Interleukin-4 (IL-4) enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen in einem Zellwachstumsmedium expandiert werden, das Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Erythropoietin (EPO), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 1, worin die peripheren Blutvorläuferzellen in einer ersten Stufe in einem Zellwachstumsmedium expandiert werden, das Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Erythropoietin (EPO), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-6 (IL-6) enthält und, worin die Zellen nach Expansion in einer zweiten Stufe in ein Medium überführt werden, das lediglich Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) aufweist, um die Differenzierung zu bewirken.

10. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Blut von Krebspatienten erhalten wird, die mit einer Chemotherapie in üblicher Dosis behandelt wurden, wobei die Chemotherapie die Anwendung von Etoposid (VP 16), Ifosfamid und Cisplatin umfaßt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, worin das Blut von Krebspatienten erhalten wurde, die mit einer Chemotherapie behandelt wurden, gefolgt von der kombinierten, aufeinander-

folgenden Anwendung von rekombinantem Humaninterleukin-3 (rhIL-3), rekombinantem humanem Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (rhGM-CSF) oder rekombinantem humanem Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (rhG-CSF).

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die CD 34⁺-Zellen aus Leukapheresat erhalten werden.

13. Dendritische Zellen, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

14. Zusammensetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren umfassend Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO) und Stammzellenwachstumsfaktor (SCF).

15. Zusammensetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, dadurch gekennzeichnet, daß sie Interleukin-1 (IL-1 β), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO), Stammzellwachstumsfaktor (SCF) und Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) aufweist.

16. Zusammensetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren umfassend Stammzellenwachstumsfaktor (SCF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).

17. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 14 bis 16, worin Interleukin-1 in einer Konzentration zwischen 10 ng/ml und 1.000 ng/ml, Interleukin-3 in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1.000 E/ml, Interleukin-4 in einer Konzentration von 50 ng/ml bis 200 ng/ml, Interleukin-6 in einer Konzentration von 10 E/ml bis 1.000 E/ml, Erythropoietin in einer Konzentration zwischen 0,1 E/ml und 10 E/ml, Stammzellenwachstumsfaktor (SCF) in einer Konzentration von

10 ng/ml bis zu 1.000 ng/ml, GM-CSF in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 1.000 ng/ml und Tumornekrosefaktor- α in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1.000 E/ml vorhanden ist.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch Interferon- γ (IFN- γ) in einer Konzentration von 1 E/ml bis 1.000 E/ml umfaßt.

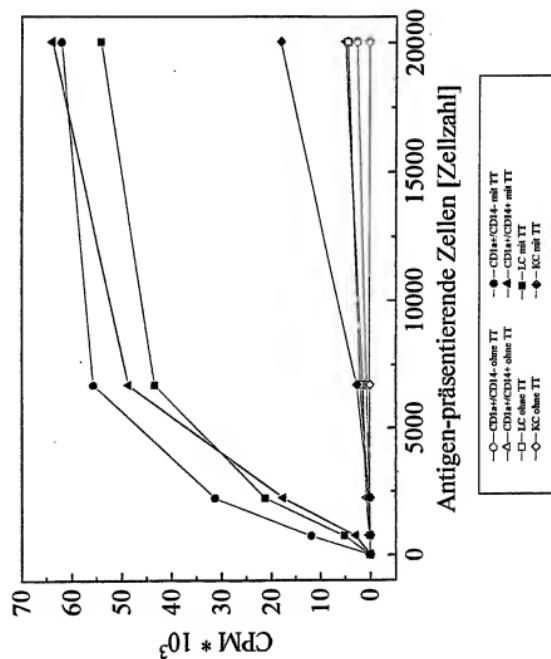
19. Behältnis für die Expansion von dendritischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18 enthält.

20. Gefäß nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zellkulturflasche ist.

21. Verwendung der dendritischen Zellen gemäß Anspruch 13 als Antigen-präsentierende Zellen zur Induktion einer Immunantwort.

Figur 1

Antigenpräsentation Dendritischer Zellen



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/00512A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/08 A61K35/14 A61K38/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 20186 (SCHERING CORP ;BANCHEREAU JACQUES (FR); CAUX CHRISTOPHE (FR)) 14 October 1993 cited in the application see the whole document	1-5,12, 13,21
Y	---	6,8-11
X	WO,A,93 20185 (STEINMAN RALPH M ;INABA KAYO (JP); SCHULER GEROLD (AT)) 14 October 1993	1,2,12, 13,21
Y	see page 8, line 13 - page 13, line 8 see page 19, line 25 - page 31, line 6 see page 74 - page 78; example 6	6,8-11
	---	-/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'B' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other specific documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

'A' document member of the same patent family

3 Date of the actual completion of the international search

3 August 1995

Date of mailing of the international search report

18.08.95

Name and mailing address of the ISA:
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 95/00512

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 21936 (SLOAN KETTERING INST CANCER ;BESMER PETER (US); BUCK JOCHEN (US);) 11 November 1993	1,4,5,7, 12,13, 16,17, 19-21
Y	see page 117, line 5 - page 121, line 28; claims 107,115,116,119,120 ---	10,11
X	BLOOD, vol. 81, no. 10, 15 May 1993 pages 2579-2584, BRUGGER ET AL 'EX VIVO EXPANSION OF ENRICHED PERIPHERAL BLOOD CD34+ PROGENITOR CELLS BY STEM CELL FACTOR,INTERLEUKIN-1BETA (IL-1 BETA),IL-6,IL-3,INTERFERON-GAMMA,AND ERYTHROPOIETIN' see the whole document ---	14,17-20
Y	BLOOD (SUPPLEMENT 1), vol. 82, no. 10, 15 November 1993 page 102a SARAYA ET AL 'HUMAN STEM CELL FACTOR (SCF) PROMOTES THE GROWTH OF DENDRITIC LANGERHANS CELLS FROM THEIR PRIMITIVE PROGENITORS (CFU-DL) IN HUMAN BONE MARROW' siehe Zusammenfassung 395 siehe Zusammenfassung 395 ---	6,8-11, 15 1,7,12, 13,16, 17,19-21
Y	DATABASE MEDLINE US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US ZUSAMMENFASSUNG 94107974, FERRAJOLI ET AL 'GROWTH FACTORS CONTROLLING INTERLEUKIN-4 ACTION ON HEMATOPOIETIC PROGENITORS' & ANN HEMATOL, (1993 DEC) 67 (6) 277-84 see abstract ---	8,9,15
A	WO,A,94 03587 (EAVES CONNIE J ;EAVES ALLEN C (CA); LANDSDORP PETER M (CA)) 17 February 1994 see page 4, line 15 - line 36 see page 29, line 14 - line 29 ---	11
P,X	BLOOD (SUPPLEMENT 1), vol. 84, no. 10, 15 November 1994 page 228a FISCH ET AL 'EX VIVO GENERATION OF FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIGEN PRESENTING CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD CD34+ HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN CANCER PATIENTS' siehe Zusammenfassung 899 ---	1,6-9, 12-17, 19-21
P,Y		10,11

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/00512

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9320186	14-10-93	EP-A-	0563485	06-10-93
		AU-B-	3928993	08-11-93
		CA-A-	2133316	14-10-93
		EP-A-	0633930	18-01-95
		JP-T-	7505527	22-06-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9320185	14-10-93	AU-B-	4046193	08-11-93
		CA-A-	2133409	14-10-93
		EP-A-	0633929	18-01-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9321936	11-11-93	AU-B-	4106593	29-11-93
		CA-A-	2133982	11-11-93
		EP-A-	0639979	01-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9403587	17-02-94	AU-B-	4693693	03-03-94
		CA-A-	2120482	17-02-94
-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 95/00512

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although Claim 21 is directed in part (for an in vivo method) to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 95/00512A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N5/08 A61K35/14 A61K38/19

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 20186 (SCHERING CORP ;BANCHEREAU JACQUES (FR); CAUX CHRISTOPHE (FR)) 14.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-5,12, 13,21
Y	WO,A,93 20185 (STEINMAN RALPH M ;INABA KAYO (JP); SCHULER GEROLD (AT)) 14.Oktober 1993 siehe Seite 8, Zeile 13 - Seite 13, Zeile 8 siehe Seite 19, Zeile 25 - Seite 31, Zeile 6 siehe Seite 74 - Seite 78; Beispiel 6 ----	6,8-11
X		1,2,12, 13,21
Y		6,8-11
		-/-

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonderes bedeutend angesehen ist
- "B" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht wurde ist
- "L" Veröffentlichung, die gezeigt ist, dass eine Vorfeststellungsanspruch zwecksicht er-schienens an der internationalen Recherchezeit genannte Veröffentlichung einer anderen als der Recherchezeit genannte Veröffentlichung vorausgegangen ist (wurde ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Später Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht wurde, die mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung einer Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "Y" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3. Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

3. August 1995

18.08.95.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde
Einschließlich Postamtamt, P.B. 5818 Postamtamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/DE 95/00512

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 21936 (SLOAN KETTERING INST CANCER ;BESMER PETER (US); BUCK JOCHEN (US);) 11.November 1993	1,4,5,7, 12,13, 16,17, 19-21
Y	siehe Seite 117, Zeile 5 - Seite 121, Zeile 28; Ansprüche 107,115,116,119,120 ---	10,11
X	BLOOD, Bd. 81, Nr. 10, 15.Mai 1993 Seiten 2579-2584, BRUGGER ET AL 'EX VIVO EXPANSION OF ENRICHED PERIPHERAL BLOOD CD34+ PROGENITOR CELLS BY STEM CELL FACTOR, INTERLEUKIN-1BETA (IL-1BETA), IL-6, IL-3, INTERFERON-GAMMA, AND ERYTHROPOEITIN'	14,17-20
Y	siehe das ganze Dokument ---	6,8-11, 15
X	BLOOD (SUPPLEMENT 1), Bd. 82, Nr. 10, 15.November 1993 Seite 102a SARAYA ET AL 'HUMAN STEM CELL FACTOR (SCF) PROMOTES THE GROWTH OF DENDRITIC LANGERHANS CELLS FROM THEIR PRIMITIVE PROGENITORS (CFU-DL) IN HUMAN BONE MARROW'	1,7,12, 13,16, 17,19-21
Y	siehe Zusammenfassung 395 ---	10,11
Y	DATABASE MEDLINE US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US ZUSAMMENFASSUNG 94107974, FERRAJOLI ET AL 'GROWTH FACTORS CONTROLLING INTERLEUKIN-4 ACTION ON HEMATOPOIETIC PROGENITORS' & ANN HEMATOL, (1993 DEC) 67 (6) 277-84 siehe Zusammenfassung ---	8,9,15
A	WO,A,94 03587 (EAVES CONNIE J ;EAVES ALLEN C (CA); LANSDRP PETER M (CA)) 17.Februar 1994 siehe Seite 4, Zeile 15 - Zeile 36 siehe Seite 29, Zeile 14 - Zeile 29 ---	11
P,X	BLOOD (SUPPLEMENT 1), Bd. 84, Nr. 10, 15.November 1994 Seite 228a FISCH ET AL 'EX VIVO GENERATION OF FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIGEN PRESENTING CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD CD34+ HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS IN CANCER PATIENTS' siehe Zusammenfassung 899 -----	1,6-9, 12-17, 19-21
P,Y	-----	10,11

3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/00512

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9320186	14-10-93	EP-A- 0563485 AU-B- 3928993 CA-A- 2133316 EP-A- 0633930 JP-T- 7505527	06-10-93 08-11-93 14-10-93 18-01-95 22-06-95
WO-A-9320185	14-10-93	AU-B- 4046193 CA-A- 2133409 EP-A- 0633929	08-11-93 14-10-93 18-01-95
WO-A-9321936	11-11-93	AU-B- 4106593 CA-A- 2133982 EP-A- 0639979	29-11-93 11-11-93 01-03-95
WO-A-9403587	17-02-94	AU-B- 4693693 CA-A- 2120482	03-03-94 17-02-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE95/00512

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt I)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

- Ansprüche Nr. 21
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der Anspruch 21 teilweise (für ein *in vivo* Verfahren) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen würde, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
- Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
- Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt I)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

- Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
- Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
- Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.